

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-240725

(43)Date of publication of application : 28.10.1991

(51)Int.Cl.

A61K 31/35

A61K 31/35

A61K 31/35

A61K 31/35

A61K 31/35

A61K 35/78

// C07D311/30

(21)Application number : 02-034916

(71)Applicant : SENJIYU SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 15.02.1990

(72)Inventor : MORISAKI MAYUMI  
INOUE ATSUSHI

### (54) MAILLARD REACTION INHIBITOR

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a Maillard reaction inhibitor, containing a flavonoid contained in Scutellariae Radix as a pharmacologically active ingredient and capable of inhibiting the formation itself of an Amadori transition reaction product which is a direct causative substance for forming intermolecular crosslinkages between protein molecules in the Maillard reaction.

CONSTITUTION: Scutellariae Radix is dipped in a mixture solution of water and a lower alcohol, preferably a mixture solution of 80-70wt.% methanol or ethanol based on 20-30wt.% water and warmed (preferably at 40-60° C) to provide an extract solution. To the resultant extract solution, is added water in an amount of 2 times based thereon. Alternatively, the alcohol is volatilized to reduce the concentration thereof to 25wt./vol.% and afford an extract composed of a sparingly water-soluble deposited substance. The obtained extract is then contained as a pharmacologically active ingredient in the objective inhibitor. The aforementioned inhibitor is used for treating or preventing various diabetic complications or diseases of the same kind (e.g. atherosclerosis, cerebral angiopathy or senile cataract) caused by aging.

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-240725

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 31/35

識別記号

ACV

AAN

ABL

ABN

ABX

ADP

庁内整理番号

7475-4C

⑬ 公開 平成3年(1991)10月28日

// C 07 D 311/30

35/78

Q

8412-4C

7252-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全6頁)

⑭ 発明の名称 メイラード反応阻害剤

⑮ 特 願 平2-34916

⑯ 出 願 平2(1990)2月15日

⑰ 発 明 者 守 先 真 由 美 兵庫県尼崎市梶ヶ島8-6

⑱ 発 明 者 井 上 淳 大阪府摂津市正雀4丁目13番57号

⑲ 出 願 人 千寿製薬株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

メイラード反応阻害剤

## 2. 特許請求の範囲

(1) 黄ごんに含まれるフラボノイドを薬理活性成分として含有することを特徴とする、メイラード反応阻害剤。

(2) 黄ごんを水と低級アルコールとの混合液に浸漬して加温して得られる抽出液より、該抽出液量の2倍以上の水を加えるか又はアルコールを気散させることにより、アルコール濃度を約25w/v%以下に低下させることによって析出して得られるエキスを薬理活性成分として含有することを特徴とする、メイラード反応阻害剤。

(3) 加温の温度が約40℃乃至60℃でかつ、水と低級アルコールの混合液が水約20乃至30重量部に対しメタノール又はエタノール約80乃至70重量部の混合液である、特許請求の範囲第2項記載のメイラード反応阻害剤。

(4) バイカリンを薬理活性成分として含有する

ことを特徴とするメイラード反応阻害剤。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はメイラード反応として知られたブドウ糖等の還元糖によるタンパク質の劣化の防止に関し、詳しくはブドウ糖がタンパク質に非酵素的に結合して生ずるアマドリ転移生成物の生成阻害剤に関する。本発明は更に詳しくは、黄ごんの特定抽出エキス又はバイカリンを含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤に関する。

(従来の技術)

タンパク質がブドウ糖等の還元糖と非酵素的に反応(以下「グリコシル化」という。)して褐色化する反応はメイラードによって1912年に報告[Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599(1912)]されて以来、食品化学の分野においてはメイラード反応の名で広く知られてきた。すなわち、貯蔵又は加熱処理を受けた食品中でタンパク質とブドウ糖とが反応して褐色化し、ついにはタンパク質分子間に交差結合が生じることに

よりタンパク質の変成が起こることが知られていた。その後、赤血球中においてヘモグロビンの小成分である Hb<sub>ai</sub>c が糖尿病患者において増加しているとのラーバーの報告 (Rahbar, S., Clin. Chim. Acta. 22: 296(1968)) を機に、生体内におけるブドウ糖とタンパク質との反応が注目され、Hb<sub>ai</sub>c の構造の解析を通じて、メイラード反応が生体内においても起こっていることが確認されるに至った。

生体中でのメイラード反応の機構はブラウンリー等によって報告されている [Brownlee, M. et al., Science, 232:1629(1986)]。即ち、先ずブドウ糖の開環構造において存するアルデヒド基が蛋白質分子中のアミノ基と反応して Schiff 塩基を形成する。この Schiff 塩基は不安定であるため速やかに分子内転移反応を起こして非酵素的にアマドリ転移生成物に変換される。タンパク質が長期間体内に保持された場合、アマドリ転移生成物は徐々に脱水反応を起こして新たなブドウ糖誘導体へと変換し、これがタンパク質分子等の種々の分

するものと考えられている。

この様な背景のもとで、生体内におけるメイラード反応を阻害する物質の探索が行なわれつつあり、例えば、前記ブラウンリー等によりアミノグアニジンがインビトロ (in vitro) でメイラード反応を阻止すること及び同物質の投与が糖尿病ラットの動脈壁における AGE の生成を抑制する事を発表している。また特開昭 62-142114 号明細書においてアミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン及びリジンがアマドリ転移生成物中の活性カルボニル基と反応してこれを封鎖し、AGE 生成を阻害することが示唆されており、特開昭 64-56614 号明細書において、例えばチオセミカルバジド類、1、3-ジアミノグアニジン、ベンゾイルヒドラジン等、及び特開昭 64-83059 号明細書において各種グアニジン誘導体がメイラード反応を抑制することが開示されている。

(発明が解決しようとする課題)

上記各特開昭明細書においては、メイラード反

子と不可逆的に交差結合して架橋を形成することにより、主としてタンパク質の重合体を形成する。

このような進行したグリコシル化生成物は通常 AGE (Advanced Glycosylation End product) と略称されるが、AGE の生成に伴い、タンパク質の生物学的適応性が減弱し溶解度が低下し、プロテアーゼの作用を受け難くなり、多くは黄褐色化し蛍光を発するに至る。

メイラード反応は健康人においても認められる現象であるが、血糖上昇を特徴とする糖尿病に特に顕著に認められる。また、メイラード反応は代謝回転の比較的緩徐なタンパク質において顕著であり、例えばコラーゲンや水晶体の構造タンパク質であるクリスタリン等において特に著しい。また、糖尿病においては神経障害、白内障、腎障害、網膜症、関節硬化症、アテローム性動脈硬化症等種々の合併症が認められるが、これら糖尿病合併症は老年期に多い疾病と酷似しており、正常な血糖値にあっても、ブドウ糖が代謝回転の緩徐なタンパク質をグリコシル化して徐々に AGE を形成

応の最終生成物である AGE の生成量を指標としてメイラード反応の阻害剤の検討を行なっているが、本発明者はメイラード反応におけるタンパク質の重合の段階における直接的原因物質であるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害することにより極めて効果的なメイラード反応の阻害が期待できるとの観点から、アマドリ転移生成物の生成阻害作用の有無及び強さを実験上の指標とした。タンパク質のリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基の非酵素的グリコシル化によって生成するアマドリ転移生成物である  $\epsilon$ -N-(furyl-methyl)-L-lysine (以下「フロシン」という。) の測定値をタンパク質の非酵素的グリコシル化の指標となし得ることは、Bruggemann 等 [J. Bruggemann et al., Lebensw. Unters. Forsch., 137: p.137-143 (1968)] および Finot 等 [P.A. Finot et al., Experientia, 24: p.1097-1099 (1968)] によって報告されている。本発明者はブドウ糖含有タンパク質水溶液を用いてフロシンを生成させることを試み、適当な生成条件を求めて検討を重ね、それにより

確立した条件に従って種々の物質のフロシン生成阻害効果の有無および強さについて検討した。その結果本発明者は、黄ごん (*Scutellariae Radix*) より水アルコール混合液等により加温下容易に抽出して得られるエキスを強いフロシン生成阻害効果があることを見だし、更に検討を重ねて本発明を完成するに至った。

(問題点を解決するための手段)

すなわち、本発明は、黄ごんに含まれるフラボノイドを薬理活性成分として含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤であり、また、黄ごんを水アルコール混合液に加温しながら浸漬することにより得られる抽出液に水を加えて析出させて採取することのできる、水に難溶性の析出物よりなるエキス(以下「エキスA」という。)を薬理活性成分として含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤であり、更に、黄ごんに含有されるフラボノイドの一つであるバイカリンを含有する事を特徴とするメイラード反応阻害剤である。

黄ごんはコバネバナ [*Scutellaria*

はこれに含有される各成分についてのメイラード反応阻害作用に関する報告は未だなく、本発明者らの研究によって初めて明らかにされたものである。

黄ごんに含まれるフラボノイドは、黄ごんを例えば水、アルコールまたはこれらの混合液に浸漬し加熱することにより、バイカリン、バイカレイン、オウゴンその他多数の成分を含む抽出物として得ることができる。

黄ごんよりエキスAを得るには、例えば黄ごん末に精製水を加えて2乃至3時間40乃至60℃に加温して前処理した後、エタノール又はメタノール等の低級アルコールを加えてアルコール濃度を約70~80w/v%として加温下に更に浸漬し、加温下に濾過して、場合により更に濾液にセルロースを加えて再度濾過し、濾液に水を加えるか又はアルコールを減圧留去等により除くことにより、アルコール濃度を約25w/v%以下として放置し析出する結晶を濾取、乾燥することによって得ることができる。エキスAは主としてバイ

*baicalensis Gorgi (Labiateae)* ] の周皮を除いた根であり、黄ごん湯、黄連解毒湯、小柴胡湯、大柴胡湯その他多数の処方に配合されており、漢方薬において重用されている生薬である。黄ごんには、バイカリン、バイカレイン、オウゴンその他のフラボノイドが含有されることが知られている。黄ごんに含まれる成分の薬理作用としては、黄ごんのエタノールエキス、バイカリン (*baicalin*) 及びバイカレイン (*baicalein*) に胆汁排泄促進作用、利尿作用、緩下作用、抗アレルギー作用が、メタノールエキスに抗炎症作用及び解熱作用が、エーテルエキスには抗菌作用が、バイカリン及びバイカレインに網細血管透過性抑制作用、抗アセチルコリン作用、抗アナフィラキシー作用、実験的喘息抑制作用、バイカリンには肝障害による血清GOT、GPT値上昇抑制作用、フラボノイド成分に肝コレステロール、遊離脂肪酸、トリグリセリド低下作用等が既に知られている(以上第11改正日本薬局方解説書、D-115、1986年)。しかしながら、黄ごんの抽出エキス又

カレインを含有し、他に少量のオウゴンおよび微量のバイカリンその他の塩化第二鉄ノタノールによる液呈色反応陽性の物質を含有する。

本発明のメイラード反応阻害剤はメイラード反応を原因として生ずると考えられる前述の諸疾患の治療又は予防に用いることができる。

当該目的に供する場合、本発明のメイラード反応阻害剤は経口的に又は非経口的に投与することができる。また、非経口的投与の場合には例えば点眼剤等として局所的に投与することもできる。

本発明のメイラード反応阻害剤の投与量は、経口投与においては通常、1日量1mg~1000mgの範囲、より好ましくは1日量5mg~200mgの範囲で、また点眼液剤としての投与においては通常、0.05w/v%~5w/v%の範囲、より好ましくは0.1w/v%~2.0w/v%の範囲の水性の液として、投与を行なうことができる。ただし、投与量はこれらの記載によって必ずしも限定されるものではなく、疾患の種類、重症度及び治療計画等により適宜設定され得る。

本発明のメイラード反応阻害剤は、経口投与のための例えば錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤若しくはカプセル剤等また点眼のための例えば点眼液剤、もしくは点眼軟膏剤等の適宜の形態にすることができる。

本発明のメイラード反応阻害剤を経口投与用錠剤の形態とするには、例えばヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、コーンスターチ、ポリビニルピロリドン、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム等の希釈剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、纖維素グルコン酸カルシウム等の崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸等の溶解補助剤その他錠剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。また本発明のメイラード反応阻害剤を点眼剤の形態とするには、例えば、リン酸塩、ほう酸塩、酢酸塩、クエン酸塩又はグルタミン酸等の緩衝剤、クロロブタノール、クロロヘキシジンジグルコネート、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは塩化ベンザルコニウム等の保存剤、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、

チオ硫酸ナトリウム又はエデト酸二ナトリウム等の安定化剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム及びグリセリン、マンニトール、ソルビトール等の等強化剤、又はポリソルベート80、シクロデキストリン等の溶解補助剤、その他点眼剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。

#### (作用)

本発明のメイラード反応阻害剤は、メイラード反応におけるタンパク質分子間架橋形成の直接の原因物質たるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害するので、種々の糖尿病合併症、例えば冠動脈性心疾患、抹消循環障害、脳血管障害、神経症、腎症、動脈硬化、関節硬化症、白内障及び網膜症又は老化により引き起こされる同種の疾患例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、脳血管障害、老人性白内障等の治療又は予防に用いられる。

#### (実験例)

本発明のメイラード反応阻害剤の効果は下記の実験により確認した。

バイカリン、バイカレイン及びオウゴニン市販のもの(米山薬品工業)を使用し、エキスAは以下の方法によって調整して使用した。

#### エキスAの調整

黄ごん末10gに精製水60mlを加え、50℃にて3時間の浸漬により前処理した後、浸漬液にエタノール180mlを加えて、50℃にて更に1時間浸漬することにより抽出を行い、温時透過して濾液を得る。加温下に該濾液にセルロース約30gを添加して攪拌した後透過し、濾液に濾液の液量の約2倍量相当するの精製水を加え、4℃にて冷却して放置し、析出物を濾取し乾燥して、エキスAとして黄色結晶0.55gを得た。

#### エキスAの組成

上記抽出によって得られたエキスAは、薄層クロマトグラフィー(シリカゲルArts 5715:メルク社製)上、n-ブタノール:酢酸:水(40:10:50)の混合液による展開後、塩化第二鉄メタノール液(1w/v%溶液)の噴霧による呈色反応で、標品であるバイカレイン(Rf

値:0.85)に対応する位置(Rf値:0.82)に強い呈色反応が、標品であるオウゴニン(Rf値:0.88)に対応する位置(Rf値:0.88)に中等度の呈色反応が、標品であるバイカリン(Rf値:0.35)に対応する位置(Rf値:0.35)に微弱な呈色反応が、並びにRf値0.28およびRf値0.43にそれぞれ微弱な呈色反応がみられた。また同一試料、同一条件による展開についての50%硫酸噴霧による呈色反応によっても同様の結果が得られた。これらの結果から、エキスAはバイカレインを主成分とし、他にオウゴニンと微量のバイカリンその他少なくとも2種のフラボノイドと推定されるフェノール性水酸基保有物質を含有する。

#### (実験方法)

牛血清アルブミン(No. A-8022:シグマ社)(以下「BSA」と略記する。)及びpH7.3の50mMリン酸緩衝液及び表1に示す各試験試料及びアミノグアニジンを用いて下記の通りのサンプル溶液を無菌的に調製し、37℃で4週間保存

し、非酵素的グリコシル化の進行に伴って生成するフロシンを Schleicher 等の方法 [E. Schleicher et al., J. Clin. Biochem., 19: p 81-87 (1981)] に準じて高速液体クロマトグラフィーにより定量した。すなわち、反応後のサンプルを透析後、各 1 ml を凍結乾燥し、6 N 塩酸 1 ml を加えて 100℃ で 20 時間加水分解を行い、塩酸を留去した後、水 1 ml を加えて 0.45 μm のフィルターにて濾過し、高速液体クロマトグラフィー用の試料とした。カラムには ODS-120T (東ソー) を、溶離液には 7 mM のリン酸溶液を用い、検出波長 280 nm 及び 254 nm にての吸収ピークの比が 3.9 : 1 であるピークをフロシンのピークとした。

(リン酸緩衝液中の組成)

(正常群) : BSA 20 mg/ml

(対照群) : BSA 20 mg/ml + ブドウ糖 50 mM

(被験群) : BSA 20 mg/ml + ブドウ糖 50 mM + 試料

バイカリン	31.2
アミノグアニジン	8.0

#### 【実施例】

本発明のメイラード反応阻害剤の製剤実施例を示す。

##### (実施例 1) 内服錠

下記成分を 1 錠分として常法により製造する。  
必要に応じ糖衣を施す。

エキス A	50 mg
乳糖	80 mg
コーンスターチ	17 mg
ステアリン酸マグネシウム	3 mg

##### (実施例 2) 内服錠

下記成分を 1 錠分として常法により製造する。

試料濃度 : エキス A : 2 mg/ml

バイカリン : 5 mM

アミノグアニジン : 5 mM

各群のサンプルのフロシン定量結果より、次の式を用いて各被験物質のフロシン生成阻害率を算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (c - d) \div (c - n) \times 100$$

但し、c : 対照群のフロシンのピーク面積

d : 被験群のフロシンのピーク面積

n : 正常群のフロシンのピーク面積

(結果)

次の表 1 に示すとおり、エキス A およびバイカリンにはメイラード反応の公知の阻害剤たるアミノグアニジンに較べてそれぞれ著しく強い阻害効果が認められた。

表 1

被験物質	阻害率 (%)
エキス A	53.4

必要に応じ糖衣を施す。

バイカリン	100 mg
コーンスターチ	90 mg
乳糖	30 mg
ヒドロキシプロピルセルロース	25 mg
ステアリン酸マグネシウム	5 mg

##### (実施例 3) カプセル剤

下記成分を常法に従って混和し、顆粒状としたものをカプセルに各 1 個 100 mg 充填する。

エキス A	10 mg
コーンスターチ	45 mg
乳糖	20 mg
結晶セルロース	24 mg
タルク	0.5 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.5 mg

##### (実施例 4) 点眼剤

下記の成分を常法により混合攪拌して懸濁液とし、加熱滅菌の後容器に無菌充填して製する。

エキス A	0.1 g
リン酸二水素ナトリウム	0.1 g

塩化ナトリウム	0.7g
エデト酸二ナトリウム	0.02g
クロロブタノール	0.2g
ポリソルベート80	0.2g
ポリビニルピロリドンK30	0.15g
亜硫酸ナトリウム	0.2g
1N NaOH	適量
滅菌精製水	適量

1N NaOH	適量
滅菌精製水	適量
全量	pH 6.5 100ml

特許出願人 千寿製薬株式会社

## (実施例5) 点眼剤

下記成分を常法により混合して溶液とし、無菌  
濾過して容器に充填して点眼剤とする。

バイカリン	0.3g
塩化ナトリウム	0.3g
マンニトール	0.2g
酢酸ナトリウム	0.2g
エデト酸ナトリウム	0.02g
ポリソルベート80	0.1g
クロロブタノール	0.2g
亜硫酸ナトリウム	0.2g